UNIVERSITE DE MONTPELLIER N° 26

FACULTÉ DE MÉDECINE

LE

DIAGNOSTIC DES TACHES DE SANG

PAR LES CRISTAUX D'HÉMATINE

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 29 Juillet 1914

PAR

Ivan ATHANASSOFF

Né à Tirnovo-Seymen (Bulgarie), le 9 Janvier 1884

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(MENTION MÉDECINE)

Examinateurs de la Thèse { SARDA, professeur, *Président.* / VIRES, professeur. / DERRIEN, agrégé. / EUZIÈRE, agrégé. } *Assesseurs.*

MONTPELLIER

IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE

Rue Ferdinand Fabre et Quai du Verdanson

1914

LE

DIAGNOSTIC DES TACHES DE SANG

PAR LES CRISTAUX D'HÉMATINE

UNIVERSITE DE MONTPELLIER N° 26

FACULTÉ DE MÉDECINE

LE

DIAGNOSTIC DES TACHES DE SANG

PAR LES CRISTAUX D'HÉMATINE

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 29 Juillet 1914

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PAR

Ivan ATHANASSOFF

Né à Tirnovo-Seymen (Bulgarie), le 9 Janvier 1884

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(MENTION MÉDECINE)

Examinateurs de la Thèse { SARDA, professeur, *Président.* / VIRES, professeur. / DERRIEN, agrégé. / EUZIÈRE, agrégé. } *Assesseurs.*

MONTPELLIER

IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE

Rue Ferdinand Fabre et Quai du Verdanson

1914

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Administration

MM. MAIRET (✲)	DOYEN.
SARDA	ASSESSEUR.
IZARD	SECRÉTAIRE

Professeurs

Clinique chirurgicale	MM. TEDENAT (✲).
Clinique médicale	CARRIEU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses	MAIRET (✲).
Physique médicale	IMBERT.
Botanique et histoire naturelle médicales	GRANEL.
Clinique chirurgicale	FORGUE (✲)
Clinique ophtalmologique	TRUC (O ✲).
Chimie médicale	VILLE.
Physiologie	HEDON.
Histologie	VIALLETON.
Pathologie interne	DUCAMP.
Anatomie	GILIS (✲).
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ESTOR.
Microbiologie	RODET.
Médecine légale et toxicologie	SARDA.
Clinique des maladies des enfants	BAUMEL (✲).
Pathologie et thérapeutique générales	BOSC.
Hygiène	BERTIN-SANS (H)
Clinique médicale	RAUZIER (✲).
Clinique obstétricale	VALLOIS.
Thérapeutique et matière médicale	VIRES.
Anatomie pathologique	N...

Professeurs adjoints : MM. DE ROUVILLE, PUECH, MOURET.

Doyen honoraire : M. VIALLETON.

Professeurs honoraires : MM. E. BERTIN-SANS (✲), HAMELIN (✲), GRASSET (O ✲).

Secrétaire honoraire : M. GOT.

Chargés de Cours complémentaires

Clinique gynécologique	MM. DE ROUVILLE, prof.-adj.
Accouchements	PUECH, profes.-adjoint.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURET, profes.-adj.
Pathologie externe	LAPEYRE, agr. l. (ch. de c.)
Clinique des maladies des voies urinaires	JEANBRAU, a. l. (ch. de c.)
Clinique ann. des mal. syphil. et cutanées	VEDEL, agr. l. (ch. de c.)
Médecine opératoire	SOUBEYRAN, a.l. (ch. de c.)
Clinique annexe des maladies des vieillards	EUZIERE, agrégé.
Accouchements	P. DELMAS, agrégé.

Agrégés en exercice

MM. GALAVIELLE.	MM. CABANNES.	MM. RIMBAUD.
GRYNFELTT.	DERRIEN.	ROGER.
LAGRIFFOUL.	P. DELMAS.	ETIENNE.
LEENHARDT.	MASSABUAU.	LISBONNE.
GAUSSEL.	EUZIERE.	MARQUÈS, ch. des F.
RICHE.	J. DELMAS.	

Examinateurs de la thèse ;

MM. SARDA, professeur, *président.*	MM. DERRIEN, *agrégé.*
VIRES, professeur.	EUZIERE, *agrégé.*

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation

A MA MÈRE ET A MON PÈRE

Faible témoignage d'un amour éternel.

I. ATHANASSOFF.

A MES SŒURS

A MON FRÈRE

A MES BEAUX-FRÈRES

I. ATHANASSOFF

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR SARDA

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VIRES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ DERRIEN

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ EUZIÈRE

I. ATHANASSOFF.

AVANT-PROPOS

Au début de ce travail, qui est la consécration de nos études médicales, nous nous faisons un devoir très agréable d'adresser quelques paroles de gratitude à tous ceux qui, par leurs leçons, par leurs conseils et leurs exemples ont contribué à notre instruction médicale et à notre éducation professionnelle.

Et tout d'abord, notre premier devoir est de remercier notre cher maître, M. le professeur Sarda, de nous avoir indiqué le sujet de notre travail, de nous avoir guidé dans son exécution et de l'honneur qu'il nous fait de présider notre jury.

Dès le début de nos études, nous avons été favorisé par sa sympathie; nous avons eu souvent recours à ses conseils et nous trouvons ici la place pour lui dire combien notre gratitude est profonde.

Nous avons suivi avec grand intérêt ses leçons de médecine légale, où nous avons admiré l'érudition scientifique la plus étendue de l'expert.

Pour être médecin-légiste, dit M. le professeur Brouardel, il faut des connaissances complètes en médecine, chirurgie et accouchements, savoir faire une autopsie, reconnaître les lésions spontanées des lésions provoquées, être exercé aux recherches microscopiques, nécessaires pour distinguer les taches de sang, de sperme, de méconium, etc., avoir étudié les symptômes, les lésions déterminées par diverses intoxications.

A côté de ces qualités scientifiques, M. le professeur Sarda nous a appris que le médecin-légiste doit avoir de hautes qualités morales : l'honnêteté, le dévouement, l'impartialité et la conscience, doivent primer tout chez le médecin, et nous tâcherons de copier l'exemple de ce grand maître.

A M. le professeur Vires, notre maître le plus admiré, nous adressons nos remerciements les plus sincères. Nous garderons un souvenir ineffaçable de ses leçons magistrales, que nous avons suivies avec tant d'intérêt, depuis qu'il possède la chaire de thérapeutique. Nous avons aussi des raisons toutes particulières de lui être reconnaissant, pour les conseils qu'il nous a prodigués pendant deux longues années de souffrances.

Nous sommes particulièrement touché de l'honneur que nous font MM. les professeurs agrégés Derrien et Euzière, en acceptant de faire partie de notre jury ; nous les en remercions bien sincèrement.

Nous remercions aussi nos camarades Français, qui nous ont accueilli avec toute la sympathie et toute la cordialité qui caractérisent le cœur français. Aussi nous avons beaucoup de peine à quitter ce beau pays où nous avons passé le meilleur temps de notre jeunesse. Mais nous avons encore beaucoup de devoirs envers la Patrie, que nous avons servie pendant dix longs mois, au mépris de toutes les souffrances physiques et morales, au mépris des balles de l'ennemi, du choléra, etc. C'est là où nous allons apporter les fruits que nous avons recueillis dans le pays du progrès et de la civilisation.

LE

DIAGNOSTIC DES TACHES DE SANG

PAR LES CRISTAUX D'HÉMATINE

INTRODUCTION

Il arrive souvent aux médecins légistes d'être interpellés par les juges sur la nature de certaines taches, qui se trouvent sur les vêtements, sur la lame d'un couteau ou sur un autre objet quelconque. Généralement les taches que forme le sang sont faciles à reconnaître, par leur couleur et l'aspect qu'elles présentent. Mais, lorsque ces taches siègent sur des étoffes noires ou sombres, lorsqu'elles sont vieilles et ont subi l'influence des modifications atmosphériques, de la chaleur, de l'humidité, etc., elles présentent des altérations qui font naître des doutes sur leur nature. Ces cas sont les plus fréquents en médecine légale, ce sont aussi les plus difficiles à interpréter et voilà pourquoi le médecin légiste est appelé souvent à se prononcer.

Divers procédés sont à la disposition du médecin, qui lui permettent, dans la majorité des cas, d'arriver à un diagnostic précis. Ces procédés ont pour but de mettre en

évidence les caractères propres du sang, qui le font distinguer des taches qui présentent un aspect plus ou moins analogue à celui des taches de sang, tels que les excréments de puces, de punaises, de mouches, taches de rouille, etc.

Un premier procédé consiste dans la recherche des hématies, par l'examen microscopique. Ce procédé n'a plus guère aujourd'hui qu'un intérêt historique, car il est bien difficile, sinon impossible, de distinguer le sang de l'homme de celui d'un mammifère, dont la différence consiste dans les dimensions de leurs globules.

Le problème devient encore plus insoluble lorsqu'il s'agit de sang desséché, dont les globules sont déformés. On a bien imaginé des liquides régénérateurs, mais ils ne font que gonfler les globules et changer leur forme et leurs dimensions.

Le professeur Florence a rendu un grand service à la médecine légale, en l'enrichissant d'un nouveau procédé pour la recherche des hématies par le microscope. Il a fait construire un appareil dans lequel il a appliqué le principe de l'éclairage par en haut des préparations non transparentes.

Un autre procédé consiste dans la recherche de la précipito-réaction, qui est beaucoup plus sensible, beaucoup plus précise que la précédente. Cette réaction est basée sur les propriétés bactéricides et cytolytiques des sérums, qui sont spécifiques, c'est-à-dire que le sérum d'un animal A injecté avec le sang d'un autre animal B n'est agglutinant, globulicide et précipitant que pour le sang de l'animal B et non pour celui d'autres animaux.

On utilise aussi l'examen spectroscopique des solutions sanguines. Les bandes d'absorption de l'oxyhémoglobine, de l'hématine, de l'hémochromogène ou de l'hématoporphyrine sont très caractéristiques.

Le sang peut encore être caractérisé par les réactions colorées ou réactions chimiques et qui sont basées sur les propriétés oxydantes de l'hémoglobine et de ses dérivés ferrugineux sur certains réactifs qui, en présence d'eau oxygénée ou d'essence de térébenthine sont susceptibles de former des composés colorés. Il en existe un grand nombre, mais ils n'ont qu'une valeur négative et on ne doit y avoir recours que comme procédé d'orientation.

Un dernier procédé, le plus caractéristique, le plus usité et le plus sûr, c'est celui de la microcristallisation. Ce procédé cristallographique, dit le docteur Piga, a une valeur extraordinaire en médecine légale; pour nous, un cristal bien formé, apporte plus de certitude qu'un globule rouge restauré. Rien ne peut en imposer pour un cristal parfait, tandis que beaucoup de choses peuvent simuler une hématie restaurée.

Nous nous proposons de passer en revue les principaux procédés et surtout ceux qui sont les plus usités en médecine légale.

Mais, avant de passer à l'exposé de ces procédés, nous placerons ici, à titre d'historique une énumération de tous les procédés de microcristallisation, telle que nous la trouvons rédigée par le docteur Piga, dans le n° XXXIII de *Revista Sanitaria de Toledo,* du 16 juin 1914:

1° Traitement du sang par la solution de chlorure de sodium et acide acétique, proposé par Teïchemann, en 1853. Tamassia a donné une technique.

2° Action de l'acide acétique, sans intervention de chlorure de sodium, sans élever la température *y bajo cubre-objetos* (Teïchemann);

3° Traitement par acide acétique, seul, sans action de la chaleur et de l'évaporation dans le vide, ou avec acide sulfurique (Dragendorf), ou à l'air libre (Majone);

4° Traitement par acide acétique, sans intervention du chlorure de sodium, sans couvre objet et avec l'aide d'une température très élevée (Lecha-Marzo, Piga) ;

5° Méthode de l'acide formique (Teïchemann, Kobert, Perrando) ;

6° Méthode de l'acide lactique (Kobert, Perrando) ;

7° Méthode de l'acide acétique et de l'acide pyrogallique (Wellsch et Lecha) ;

8° Traitement par l'acide formique et l'oxyde de mercure (Axenfeld) ;

9° Traitement par le péroxyde de manganèse et acide formique (Axenfeld) ;

10° Traitement par le cinabre et l'acide acétique (Axenfeld) ;

11° Précipitation de la matière colorante du sang par acide tannique et ensuite traitement par le chlorure de sodium et acide acétique (Gunnlng) ;

12° Emploi des iodures et bromures de sodium, de potassium, d'ammonium, de strontium avec acide acétique (Teïchemann, Helœig, Husson, Sarda et ses élèves). Emploi simultané des divers sels (Nipp, 1913) ;

13° Méthode de Strzyzowski. Emploi d'un réactif spécial (acide acétique glacial, eau distillée, alcool ââ, 5 cc., acide iodhyrique XXV gouttes) ;

14° Méthode de Eyssautier : traitement du sang par le nitrate de platine en solution dans l'acide acétique, séparation par éther, traitement par iodure de potassium et finalement par l'acide acétique ;

15° Emploi du fluorure de sodium et acide acétique proposé par Welsch et Lecha-Morzo et repris par Cevidalli.

CRISTAUX DE CHLORHYDRATE D'HEMATINE OU CRISTAUX D'HEMINE

(Teichemann)

Le sang est composé par un liquide : le plasma sanguin, tenant en suspension des éléments figurés qui sont les hématies, éléments spécifiques et très caractéristiques. Les hématies sont essentiellement formées par une trame incolore, le stroma globulaire qui est de nature organique, la globuline et une substance colorante ou pigment rouge, hématine, qui est un composé chimique.

L'hémoglobine, résultant de l'union de la globuline et de l'hématine, est susceptible de cristalliser, mais ces cristaux ne peuvent guère être obtenus que lorsque on opère avec du sang frais et liquide. Ce procédé ne peut pas être employé dans la pratique médico-légale où l'on se sert, dans la grande majorité des cas, de taches de sang desséché. Aussi s'adresse-t-on toujours à l'hématine, qui offre une grande résistance aux agents physiques : chaleur, sécheresse, humidité, putréfaction. L'hématine donne des cristaux dont les caractères sont spéciaux et qui sont le meilleur signe de la présence du sang.

***

C'est Teïchemann qui, le premier, en 1853, obtint des cristaux d'hématine en chauffant du sang avec de l'acide acétique. Il prit ces cristaux pour de l'hématine cristalli-

sée et les appela cristaux d'hémine pour les distinguer de l'hématine ordinaire ou amorphe.

Plus tard, Lehmann a obtenu des cristaux de la matière colorante du sang en le traitant par un mélange d'alcool et d'éther tenant en dissolution de l'acide oxalique.

Hoppe Seyler reprit l'étude de ces cristaux et reconnut la présence dans leur molécule de l'acide chlorhydrique.

Ce procédé pour l'obtention des cristaux de chlorhydrate d'hématine, consiste à traiter le sang ou la solution aqueuse d'une tache de sang par l'acide acétique en présence de chlorure de sodium. Deux cas peuvent se présenter: traiter la tache elle-même ou bien sa solution aqueuse.

Premier cas. — On a une mince écaille de sang desséché qu'on place directement sur la plaque porte-objet. Si l'écaille n'est pas complètement sèche, on chauffe légèrement pour obtenir une dessiccation aussi complète que possible. On place à côté de l'écaille un petit cristal de chlorure de sodium et avec le bout de la baguette en verre trempé dans l'acide acétique cristallisable, on dépose sur la tache une goutte de cet acide. Ensuite on chauffe à une douce chaleur pour évaporer l'acide, ce que l'on reconnaît à l'odeur. Lorsqu'il ne se dégage plus d'acide, on examine au microscope. Souvent il est utile d'ajouter de nouveau une ou deux gouttes d'acide et d'évaporer pour avoir une préparation plus claire et des cristaux plus nets.

Deuxième cas. — Il est préférable de dissoudre la tache sanguine dans un verre de montre avec de l'eau distillée. Une goutte de cette solution, qui a pris une coloration rougeâtre, est placée sur une lame de verre que l'on chauffe à une douce chaleur jusqu'à dessiccation complète. Il importe de ne pas dépasser 60°, car au delà l'albumine se coagulant apporterait un obstacle à la production des cris-

taux. Il est aussi important de chauffer d'abord la périphérie du liquide pour éviter l'étalement de la goutte, car il est préférable que la solution sur laquelle se feront les manipulations ultérieures, ait un certain degré de concentration. A la goutte ainsi desséchée on ajoute un petit cristal de chlorure de sodium et une ou deux gouttes d'acide acétique cristallisable. On chauffe légèrement jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de vapeurs d'acide acétique, puis on examine au microscope. Quand on opère dans de bonnes conditions on obtient des cristaux très nombreux et leurs caractères les font reconnaître sans hésitation. Souvent il n'en est pas ainsi et l'on ne voit que de petites masses amorphes de matière colorante, dans ce cas, on ajoute une goutte d'acide acétique et on évapore de nouveau. En recommençant deux ou trois fois cette opération, on finit par obtenir des cristaux disposés en croix ou en étoile et on est sûr d'avoir ainsi obtenu des cristaux de chlorhydrate d'hématine.

Ces cristaux ont une couleur qui varie du jaune rougeâtre au brun sombre. Leurs dimensions varient entre 1 μ et 20 μ. Ils sont remarquables par leur résistance et se conservent presque indéfiniment. On obtient de meilleurs résultats si, au lieu d'employer un cristal de chlorure de sodium, on se sert d'une goutte de solution à $\frac{1}{1000}$ de chlorure de sodium.

Pour toutes ces manipulations deux choses sont très importantes: l'acide acétique employé doit être monohydraté; il faut, en second lieu, s'armer de patience, ne pas se hâter, pour ne pas dépasser la température de 50°-60° lorsqu'on dessèche la goutte de solution ou lorsqu'on évapore l'acide acétique. Dans le premier cas les cristaux seraient excessivement petits et sous forme d'une fine poussière insuffisante pour le diagnostic. Dans le second

cas l'acide acétique en ébullition éclaterait sur les bords de la lamelle couvre-objet sous forme de petites bulles qui la déplaceraient. Les cristaux, dans ce cas, sont encore petits et il faut les chercher sur les bords de la préparation.

LES PROCEDES DE HUSSON ET DE CAZENEUVE POUR OBTENTION DES CRISTAUX D'IODHYDRATE ET DE BROMHYDRATE D'HEMATINE.

Nous trouvons dans les comptes rendus des séances de l'Académie des sciences de 1875, une communication faite par le pharmacien Husson, de Toul, dans laquelle il dit:

« L'hémoglobine en absorbant l'iode se dédouble en hématine et en globuline. Le microscope indique lui-même le dédoublement de l'hémoglobine. En effet, lorsque la combinaison de l'iode avec les globules se fait sous le champ du microscope, les bords du disque deviennent plus accentués; puis, peu à peu, on voit se former de nombreuses granulations, qui ne sont autre chose que de l'hématine précipitée. En faisant arriver sous le couvre-objet une goutte d'acide acétique cristallisable, et en chauffant avec précaution, on obtient des cristaux analogues à ceux d'hémine, mais plus foncés et d'une teinte plus violacée. Il s'est formé de l'hémine iodée, iodhydrate d'hématine ».

Puis il décrit la manière d'opérer de la façon suivante:

« Lorsque le sang se trouve sur une étoffe, on coupe, à l'aide de ciseaux, une bandelette au milieu de la tache, et on suspend le morceau dans un petit tube homéopathique, où se trouvent quelques gouttes d'eau distillée. Dès que le liquide a pris une légère teinte jaune, on peut procéder à l'opération qui, pour être nette, ne devra pas être faite avec une solution concentrée.

» Quand le sang se trouve sur du bois ou du fer, on en râcle une portion dans un verre de montre, où l'on a mis deux ou trois gouttes d'eau, et l'on attend que le liquide paraisse légèrement coloré en plaçant le verre sur une feuille de papier blanc.

Cela fait, on plonge une baguette dans le liquide provenant de l'une ou de l'autre opération, puis on touche avec elle une plaque de verre à microscope; on évapore avec précaution le liquide déposé. Si le résidu est peu visible par transparence, on dépose une nouvelle goutte, qu'on dessèche de nouveau.

Alors on laisse tomber sur la tache ainsi obtenue, une goutte de *solution d'iodure de potassium au* 1/20e. On évapore de nouveau, puis on met le couvre-objet, et l'on fait arriver un peu d'acide acétique cristallisable. On chauffe à la lampe à alcool, jusqu'au moment où il se dégage quelques bulles; après refroidissement, on examine au microscope; on voit alors les cristaux d'hémine iodée.

Les cristaux d'hémine iodée appartiennent, comme ceux de l'hémine chlorée au système rhomboïdal, se présentent sous la forme de petits bâtonnets qui s'entrecroisent et semblent former des étoiles ou des croix de Malte. Ils sont plus foncés que les cristaux fournis par le chlorhydrate d'hémine, qui souvent disparaissent dans la masse de chlorure de sodium.

Avec le bromure de potassium on obtient, de la même façon, des cristaux d'hémine bromée, analogues aux précédents, mais ayant une teinte généralement rosés ».

A la fin de sa communication, le pharmacien de Toul dit: « L'acide acétique cristallisable donne seul, sans le secours d'aucun réactif, de magnifiques cristaux d'hémine acétique ». Nous savons aujourd'hui que ce sont des cris-

taux de chlorhydrate d'hématine formés aux dépens du chlorure de sodium du sang.

En critiquant le procédé de Husson, dans sa thèse, Cazeneuve dit qu'il considère les cristaux obtenus par Husson comme cristaux de chlorhydrate, car dit-il, 1 0/0 de chlorure dans les iodures et les bromures, donnera des solutions de chlorure au 1/2 millième qui sont suffisantes pour donner des cristaux de chlorhydrate et il conclut, à tort, qu'il est inutile pour caractériser une tache de sang de recourir à des solutions salines qui doivent aux chlorures la propriété de donner de l'hématine.

Cazeneuve, partant du fait que les acides organiques mis en présence du sang, décomposent les chlorures, mettant l'acide chlorhydrique en liberté qui s'unit à l'hématine pour former le chlorhydrate d'hématine, cherche à former cette combinaison directement. Pour cela, il verse sur une grande quantité d'hématine pure récemment préparée, de l'éther légèrement acidifié par l'acide chlorhydrique. Il agite et après repos de quelques heures, examine au microscope et trouve des cristaux très nets. Il analyse les cristaux obtenus et trouve de l'acide chlorhydrique dans leur molécule et les considère comme une combinaison de l'hématine avec cet acide.

Mais pour la pratique médico-légale, voici le procédé qu'il recommande :

« On prend un tube que l'on effile à la lampe sur une longueur d'un centimètre, de manière à ce que la partie effilée soit capillaire et retienne de l'eau, grâce à la capillarité. On verse de l'eau distillée jusqu'un peu au-dessus du niveau de la partie renflée. La tache découpée dans le tissu ou isolée par raclage du corps imperméable sur laquelle elle s'est séchée, est portée à la surface de l'eau dans le tube. Quelques instants de macération suffisent

pour que l'on voie se détacher des stries de matière colorante qui teintent le liquide en se diffusant. Soufflant alors par la grosse extrémité du tube, on dépose une goutte sur la lame microscopique; on ajoute une goutte d'une solution de sel marin, au 1/1000 puis on fait évaporer doucement, presque à siccité. On évite de chauffer trop, afin que le liquide ne se trouble pas. La coagulation albumineuse est défavorable à la formation des cristaux d'hémine. On recouvre la goutte, réduite à une gustule, de la lamelle de verre, et on apporte une goutte d'acide acétique cristallisable, qui gagne la matière colorante par capillarité entre les deux lames. On fait bouillir avec précaution et l'on regarde au microscope. Si l'on ne voit pas de cristaux, on ajoute de nouveau une goutte d'acide acétique glacial. Chauffant encore et portant sous le microscope, on voit généralement après ce deuxième apport d'acide, des cristaux caractéristiques d'hémine ».

Si l'on ne possède qu'une trace imperceptible de sang, dit plus loin l'auteur, on se contente de faire macérer la tache dans une goutte d'eau, directement sur la lame microscopique. Quand le tissu est dépouillé de la matière colorante, on ajoute une faible goutte d'une solution au 1/1000 de chlorure de sodium et on poursuit l'opération comme nous avons dit.

Nous trouvons, dans le *Manuel opératoire des travaux pratiques de chimie biologique* de Denigès, quelques remarques sur l'importance de certains tours de main pour la bonne obtention des cristaux de chlorhydrate d'hématine.

Par l'évaporation successive de deux gouttes de solution sanguine concentriquement superposées, on cherche à obtenir « une tache présentant une sorte d'excavation annulaire entre les bords et son centre, car dans ces con-

ditions seules, l'acide acétique reste adhérent par capillarité en donnant une zone annulaire liquide, plus ou moins complète, suivant le degré de perfection de la préparation, laquelle zone se sature d'hémine parce qu'elle résiste la dernière à l'évaporation et, par refroidissement, abandonne des cristaux concentrés sur un espace très faible ». Il faut que la tache centrale soit assez grande pour laisser une zone annulaire assez étroite. Il faut aussi évaporer l'acide acétique avec les précautions habituelles et laisser refroidir avant que l'acide soit tout à fait évaporé, on obtient ainsi de beaux cristaux.

CRISTAUX D'HEMOCHROMOGENE EI CRISTAUX D'HEMATINE

Si nous plaçons ici ce chapitre, c'est uniquement pour être complet et encore ne mentionnerons-nous que les procédés qui donnent simultanément des cristaux d'hémochromogène et des cristaux d'hématine.

L'hémochromogène ou hématine réduite est susceptible de cristalliser.

C'est Donogany qui, le premier, en 1892, obtint des cristaux d'hémochromogène en traitant une goutte d'une solution sanguine, successivement par une goutte de pyridine, puis par une goutte de sulfhydrate d'ammoniaque.

M. le docteur Lecha-Marzo, en 1906, a imaginé un procédé qui permet l'obtention simultanée de cristaux d'hémochromogène et d'iodo ou chloro-hématine.

La découverte de Lecha-Marzo consiste dans l'emploi d'un corps oxydant qui transformerait une partie de l'hémochromogène en hématine. Pour faire la préparation, Lecha-Marzo traite le résidu de l'évaporation d'une goutte de solution sanguine, par une gouttelette d'une solution alcoolique ou aqueuse d'iode, puis par une goutte de pyridine et une autre de sulfhydrate d'ammoniaque et recouvre le tout avec une lamelle.

M. le professeur Sarda rejette l'emploi des solutions alcooliques (teinture) car elles rendent difficile le mélange

des réactifs et donnent de mauvais résultats et il les remplace par l'eau chlorée, l'eau iodée ou l'eau bromée.

Voici comment il procède : une goutte d'une solution sanguine est évaporée à une douce chaleur, sur une lame porte-objet. Après l'évaporation, il met une goutte d'eau iodée ou d'eau bromée, une goutte de pyridine et une goutte de sulfhydrate d'ammoniaque et recouvre d'une lamelle. Par ce procédé, on obtient des cristaux d'hémochromogène et des cristaux d'hématine de couleur différente suivant le réactif employé : rouge violacé pour l'eau iodée, rouge ou brun rougeâtre pour l'eau chlorée, et rouge brillant pour l'eau bromée qui, du reste, semble donner les résultats les meilleurs.

Ce procédé présente, malheureusement, un grand inconvénient, celui d'obliger l'expérimentateur à respirer les vapeurs de pyridine et sulfhydrate d'ammoniaque, qui sont très désagréables.

Les cristaux d'hématine obtenus ainsi, sont, par contre très beaux, beaucoup plus petits que ceux obtenus par le procédé de Teïchemann ; mais ils ont le grand inconvénient de ne pas se conserver au-delà de 24 heures et par conséquent ne peuvent pas servir de pièces à conviction. En outre, ils exigent un grossissement de 600 D environ.

Par conséquent, le procédé de Lecha-Marzo et la modification que lui a apportée M. le professeur Sarda, présentent un réel intérêt médico-légal, mais ils sont inférieurs au procédé qui va suivre.

CRISTAUK D'IODO ET DE BROMO-HEMATINE

Guidé par cette idée, que les investigations en médecine légale doivent être essentiellement pratiques, que les procédés de laboratoire doivent être simples et rapides, faciles à appliquer même par un débutant. M. le professeur Sarda eut l'idée, bien avant de connaître le travail de Husson, de rechercher s'il n'obtiendrait pas des résultats meilleurs en remplaçant le chlorure de sodium dans le procédé de Teïchemann, par un autre sel haloïde. L'expérience lui a donné raison et après de nombreux essais, il préconise l'emploi de potassium au millième.

Plus tard, M. le professeur Sarda et son préparateur bénévole, le docteur Ratcheff, ont employé les iodures et les bromures d'ammonium et de strontium et ont obtenu des cristaux absolument comparables à ceux que donne l'iodure de potassium. Les acides iodhydrique et bromhydrique étant mis en liberté par l'acide acétique, se combinent comme l'acide chlorhydrique avec l'hématine, pour former l'iodo ou la bromo-hématine.

La technique de ce procédé est la même que celle que nous avons précédemment décrite pour l'obtention des cristaux de chlorhydrate d'hématine: une goutte de la solution sanguine est déposée sur une lame et évaporée à une douce chaleur, puis une goutte d'une solution au millième d'un sel halogène est déposée sur le résidu et évaporée à son tour *sans dépasser la température de* 50°-60°. Une la-

melle recouvre le tout et une goutte d'acide acétique monohydraté est déposée sur les bords. Pour éclaircir les préparations, plusieurs gouttes d'acide acétique peuvent être employées et évaporées successivement. Cette adjonction d'acide est très bien supportée par les sels de potassium, de sodium et de strontium ; mais il faut l'éviter pour les sels d'ammonium.

Après évaporation de l'acide, ce qu'on reconnaît surtout à l'odeur, on porte la préparation sous le microscope pour l'observer avec un grossissement de 450-500 D.

Avant de juger les résultats ainsi obtenus, nous allons exposer le procédé recommandé par Mlle Tymtchouk, pour l'obtention des cristaux d'hématine avec le réactif de Strzyzowski, tel que nous le trouvons décrit dans sa thèse intitulée : *La Réaction microcristallographique d'hémochromogène est-elle assez sensible pour le diagnostic du sang dans la pratique médico-légale?* Nous pourrons ensuite comparer les résultats obtenus par les deux procédés.

MODIFICATION DU PROCEDE DE TEICHEMANN PROPOSEE PAR STRZYZOWSKI, PERMETTANT D'EXCLURE L'EMPLOI D'UN SEL HALOIDE.

« *Réactif nécessaire.* — On prépare fraîchement le mélange suivant, *qui ne se conservera pas au-delà de vingt-quatre heures:*

Alcool	
Eau	*dâ* 1 cc.
Acide acétique glacial	

Acide iodhydrique incolore (poids spécifique 1,5) deux gouttes (s'il est coloré en rouge III gouttes). Mêlez soigneusement, sinon l'expérience ne réussirait pas.

Mode opératoire. — Comme dans toutes les opérations précédentes, on dépose une très petite parcelle de la substance suspecte et à l'état sec sur un porte-objet. On la recouvre directement; par le bord de la lamelle, on ajoute quelques gouttes du mélange ci-dessus; ensuite, on chauffe de façon à maintenir en ébullition pendant au moins dix à vingt secondes.

Il est indispensable de combler pendant ce temps les pertes dues à l'évaporation. A l'examen microscopique (voir auparavant s'il y a assez de réactifs entre le porte-objet et la lamelle), en cas de présence du sang, on cons-

tatera une multitude de petits prismes rhombiques noirs, formés d'iodhydrate d'hématine. A l'aide de cette méthode M. Strzyzowski a pu obtenir encore avec 5/1000 de milligramme (= 0 gr. 000005) de sang frais d'homme, des cristaux parfaitement nets. Ce procédé est plus sensible et plus expéditif que celui de Teïchemann ».

NOS EXPERIENCES ET CONCLUSIONS

Conseillé par M. le professeur Sarda, nous avons entrepris une série d'expériences afin de pouvoir nous rendre compte par nous-même de la valeur, au point de vue diagnostic, de deux des procédés que nous avons exposés et qui se disputent la priorité : celui de Strzyzowski et celui de M. Sarda pour l'obtention des cristaux d'iodo et bromo-hématine.

Pour toutes ces expériences nous nous sommes tenu exactement aux indications des auteurs et nous avons toujours fait paralèllement des préparations avec l'une et l'autre méthode. Dans le cas où une préparation ne donnait pas de résultats, l'expérience était reprise trois et même quatre fois.

Nos expériences ont été faites avec du sang humain, du sang de poulet et de chien. Les cristaux obtenus se ressemblent, et nous ne pouvons pas établir de différence entre le sang humain et celui des autres mammifères. Nous avons aussi expérimenté sur du sang frais, sur du sang ancien, datant de plusieurs années, du sang putréfié et du sang envahi par la rouille sur la lame d'un rasoir.

Pour obtenir la solution sanguine, on découpe la tache à examiner avec des ciseaux en petits morceaux qu'on laisse macérer dans de l'eau distillée pendant un temps plus ou moins long, suivant l'ancienneté de la tache. Une goutte de la solution ainsi préparée est déposée sur une

lame de verre, et après dessiccation à une douce chaleur, est traitée soit par la solution d'iodure ou de bromure de potassium, soit par le réactif de Strzyzowski.

Voici les résultats obtenus :

1° Sang humain frais. — Nous avons obtenu par le procédé de M. le professeur Sarda, et dès la première préparation, de gros cristaux rhomboédriques, disposés vers la périphérie de la préparation, et de coloration différente suivant le réactif employé : rouge violacé ou violet brun plus ou moins foncé pour l'iodure de potassium ; jaune rosé pour le bromure de potassium.

Par le procédé de Strzyzowski, nous avons également obtenu des cristaux rhomboédriques de coloration brun foncé, presque noire, à peu près tous égaux entre eux, et qu'on voit sous le microscope nager dans l'excès de réactif tant qu'il n'est pas complètement évaporé.

2° Sang de chien (*datant d'un an*). — Avec l'un et l'autre procédé, nous avons eu des résultats semblables aux précédents.

3° Sang de chien (*de* 1910). — Avec le procédé de M. le professeur Sarda, mêmes résultats que précédemment.

Avec celui de Strzyzowski, les cristaux sont aussi nombreux mais deviennent plus petits.

4° Sang de poulet (*de* 1908). — Avec le procédé de M. le professeur Sarda, toujours mêmes cristaux, avec leurs colorations suivant le réactif.

Avec celui de Strzyzowski, les cristaux deviennent encore plus petits.

5° Sang de 1905. — Avec le procédé de M. le professeur

Sarda, les cristaux gardent leurs formes et colorations, mais sont plus petits.

Avec le procédé de Strzyzowski, les cristaux sont très petits et prennent la forme de petites aiguilles.

6° Sang de chien putréfié. — La putréfaction ne s'oppose pas à la formation des cristaux d'iodo et bromohématine.

Mais avec le procédé de Strzyzowski, les cristaux sont très petits et très courts.

7° Sang envahi par la rouille. — Nous avons expérimenté sur une tache de sang trouvée sur la lame d'un rasoir que M. le professeur Sarda a bien voulu mettre à notre disposition. Pour avoir la solution de cette tache, nous avons raclé la partie rouillée, que nous avons mise dans un verre de montre au contact de l'eau ammoniacale pendant trois jours, puis sur la solution ainsi préparée nous avons opéré comme nous l'avons fait pour les autres taches.

Sur les douze préparations que nous avons faites avec le réactif de Strzyzowski, nous n'avons pas obtenu des cristaux, tandis que sur les cinq préparations faites avec l'iodure de potassium nous en avons deux qui nous ont donné des cristaux.

Ces expériences nous démontrent nettement que le procédé de Strzyzowski est loin d'avoir les supériorités qu'on lui attribue, et nous serions curieux de voir les cristaux obtenus ainsi par M. Dervieux avec le sang d'une momie datant de quatre mille ans!

Incontestablement, le procédé de Strzyzowski est supérieur au procédé primitif de Teïchemann, quand il s'agit de taches de sang frais, mais pour ce qui est du sang ancien, putréfié ou envahi par la rouille, il est loin de

valoir le procédé par l'iodure et le bromure de potassium.

Le procédé de Strzyzowski a encore un grand inconvénient, c'est celui de la non-conservation de son réactif au delà de vingt-quatre heures. Nous avons essayé de faire des préparations avec le réactif qui nous avait servi la veille et nous avons toujours échoué.

Nous avons aussi essayé de remplacer l'alcool de son réactif par de l'éther et nous n'avons pas réussi davantage. „

Avec les iodures et les biomures on réussit toujours à la condition d'employer les solutions au millième et d'évaporer lentement à une douce chaleur ne dépassant pas 50°-60° centigrades.

La conclusion logique de ce qui précède est que de tous les procédés de microcristallisation, ceux qui donnent les meilleurs résultats sont encore ceux qui sont basés sur l'emploi des iodures et bromures de potassium ou de sodium; l'obtention des cristaux est plus facile, leurs dimensions sont plus grandes et permettent par conséquent de conclure sans le secours de grossissement supérieur à 450 D.

BIBLIOGRAPHIE

Teïchemann. — Zeitschrift für rationelle medecine, neue solge.

Rollett. — Kurze Mittheilung einiger resultate über die Farbes toff krystalle welche sich unter dem Ainflusse von Saüren aus dem Blute abscheiden. Vorgeley, in der Sitz ung vom, 23 juli 1863.

Husson. — Académie des sciences, 1875.

Cazeneuve. — Thèse Paris, 1876.

Dechambre. — Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales 1828.

Morache. — Les cristaux de chlorhydrate d'hématine. Annales d'hygiène et de médecine légale, 3e série, 1881.

Corin. — Recherches sur le diagnostic du sang en médecine légale. Liège, 1893.

Wurtz. — Deuxième supplément au Dictionnaire de chimie, article hémoglobine, par Lambling, 1902.

Strzyzowski (C.). — Uber ein neues Reagens und dessen Empfindlichkeit für den Krystalographischen Blutnachweis. Therapeutische Monatshefte, septembre 1902.

Bonnel. — A propos de la différenciation du sang humain et du sang animal par les cristaux d'hémoglobine. Paris, 1903.

Caffort. — Sur un nouveau procédé d'obtention des cristaux d'hémine. Thèse, Montpellier, 1906.

Dominicis. — Un nuovo et migliore modo per ottenere i cristalli di emavomogeno. Gazz. intern. di medic., mars, 1906.

Sarda et Caffort. — Académie des sciences, t. CXLIII, 1906. Sur un nouveau procédé d'obtention des cristaux d'hémine.

Lecha-Marzo. — Sobre nuestros procedimentos para el diagnostico médico-légal de las manchas de sangre, Madrid, 1907.

Denigès. — Manuel opératoire des travaux pratiques de chimie biologique de la Faculté de Bordeaux, 1907.

Poelstia. — Kliniche methoden voor het opsporen von bloed. Thèse doctorat, Amsterdam, juillet 1907.

Labat. — Sur la recherche du sang en clinique et en médecine légale. Gazette hebdomadaire des sciences médicales de Bordeaux, n° 48, 1908.

Sarda. — Résultats comparatifs des nouveaux procédés pour l'obtention des cristaux d'hémine. Bulletin Soc. méd. lég. de France, 9 novembre et 14 décembre 1908.

Barral. — Précis d'analyse chimique, biologique, pathologique et clinique. Paris, 1909.

Lecha-Marzo. — Les cristaux d'hémochromogène et les sels d'hématine. In Revue de médecine légale, 1909.

Sarda et Dusser. — Obtention des cristaux d'hémine par les iodures et les bromures alcalins. Montpellier, 1909, Montpellier Médical.

Sarda et Ratcheff. — Obtention des cristaux d'iodo-hématine par les iodures et les bromures d'ammo-

nium et de strontium. Bulletin de médecine légale, 1909.

Morel. — Technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux. Collection Testut, 1909.

Dascaloff (A.). — Sur les nouveaux procédés de diagnostic des taches de sang. Thèse de Montpellier, 1909.

Strzyzowski. — Biochimie normale et pathologique. Baillières et fils, Paris, 1910.

Sarda. — Le diagnostic des taches de sang par les cristaux d'hématine. Rapport au Congrès international de médecine légale, Montpellier 1910.

Tymtschouk (Eugénie). — La réaction microcristallographique d'hémochromogène est-elle assez sensible pour le diagnostic du sang dans la pratique médico-légale? Thèse de Lausanne, 1910.

Dervieux et Leclercq. — Le diagnostic des taches en médecine légale, 1912.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 22 juillet 1914.
Pour le Recteur,
Le Doyen de la Faculté de Médecine, délégué
MAIRET.

Vu et approuvé :
Montpellier, le 22 juillet 1914
Le Doyen
MAIRET

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leur enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !